

#6



Attorney Docket No. 04853.0071
Customer Number 22,852

THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
)
Saburo SONE et al.) Group Art Unit: 1645
)
Serial No.: 09/864,364) Examiner: Not Yet Assigned
)
Filed: May 25, 2001)
)
For: NON-HUMAN ANIMAL)
)
EXHIBITING BONE METASTASIS)
)
OF TUMOR CELLS)

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Sir:

CLAIM FOR PRIORITY

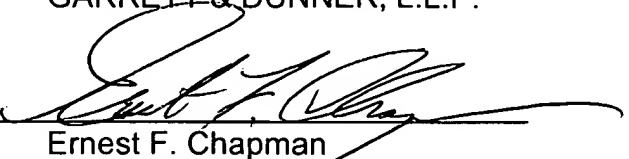
Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, Applicants hereby claim the benefit of the filing date of Japanese Patent Application No. 2001-140538, filed May 10, 2001, for the above-identified U.S. patent application.

In support of this claim for priority, enclosed is one certified copy of the priority application.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

Dated: August 17, 2001

By: 
Ernest F. Chapman
Reg. No. 25,961

LAW OFFICES
FINNEGAN, HENDERSON,
FARABOW, GARRETT,
& DUNNER, L.L.P.
1300 I STREET, N. W.
WASHINGTON, DC 20005
202-408-4000

EFC/FPD/sci
Enclosures



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 5月10日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-140538

出 願 人

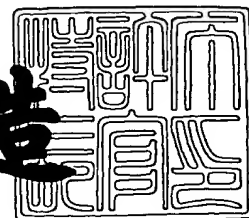
Applicant(s):

中外製薬株式会社

2001年 7月 9日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3064146

【書類名】 特許願

【整理番号】 P01-0360

【提出日】 平成13年 5月10日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/574

【発明の名称】 骨転移抑制剤のスクリーニング方法

【請求項の数】 12

【発明者】

 【住所又は居所】 香川県徳島市南佐古 7 - 9 - 5

 【氏名】 曾根 三郎

【発明者】

 【住所又は居所】 香川県徳島市庄町 3 丁目 3 1 グランドハイツ 5 0 3

 【氏名】 三木 豊和

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100096183

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 015244

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9807786

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 骨転移抑制剤のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 腫瘍の骨転移を抑制及び／または予防するための物質のスクリーニング方法であって、以下の工程(i)～(iii)：

- (i)骨転移を含む腫瘍の多臓器転移を示す非ヒトモデル動物を作製する工程、
 - (ii)該モデル動物に被験物質を投与する工程、
 - (iii)骨転移の抑制及び／または予防効果を測定する工程、
- を含む、上記スクリーニング方法。

【請求項 2】 上記非ヒトモデル動物を、骨転移を起こし得る腫瘍細胞を末梢投与により導入することによって作製する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 上記腫瘍細胞が、PTHrPを高度に発現しているヒト肺癌または乳癌由来細胞である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 上記腫瘍細胞が、ヒト肺小細胞癌（SCLC）由来の細胞である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 上記動物がげっ歯類である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 上記動物がマウスである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 上記動物が免疫不全マウスである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 被験物質が、PTHrPアンタゴニスト、抗PTHrP抗体、抗PTHrP抗体アナログ、または低分子化合物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】 腫瘍細胞の骨転移に対する治療の有効性を評価するための方法であって、以下の工程(i)及び(ii)：

- (i) 骨転移を含む腫瘍の多臓器転移を示す非ヒトモデル動物に対して治療を施す工程、及び
 - (ii)骨転移の大きさ及び／もしくは程度、及び／または骨転移が原因で生ずる症状を、対照動物と比較する工程、
- を含んでなる、上記方法。

【請求項 10】 骨転移に対する被験物質の作用を確認するための、骨転移

を含む腫瘍の多臓器転移を示す非ヒトモデル動物の使用方法であって、以下の工程(i)及び(ii)：

(i)動物に被験物質を投与する工程、及び

(ii)骨転移の大きさ及び／もしくは程度、及び／または骨転移が原因で生ずる症状を、対照動物と比較する工程、
を含んでなる、上記使用方法。

【請求項 1 1】 腫瘍の骨転移を抑制及び／又は予防するための薬剤を製造するための方法であって、以下の工程 (i) 及び (i i) ：

(i) 請求項 1 記載のスクリーニング方法により腫瘍の骨転移を抑制及び／又は予防するための物質を同定する工程、

(i i) (i) により同定される物質を製剤上許容される担体と混合する工程、
を含む、上記薬剤の製造方法。

【請求項 1 2】 上記物質が、抗PTHrP抗体又は抗PTHrP抗体アナログである請求項 1 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は腫瘍の骨転移を抑制及び／または予防するための薬剤のスクリーニング方法に関する。特に本発明は、骨転移を含む腫瘍の多臓器転移を示す非ヒトモデル動物を作製し、該モデル動物を用いた新規薬剤のスクリーニング方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

肺癌は、癌に関連した死亡の中でも世界中で一般的かつ増加しつつある原因であるが、肺癌に基づく死亡の90%以上は転移の結果である可能性がある(Yano, S.ら, Int. J. Cancer 67:211-217, 1996)。肺癌は、組織学的に、臨床的挙動の差異（腫瘍の増殖速度、腫瘍の発達パターン、化学療法及び放射線療法に対する感受性）に基づいて、小細胞癌（SCLC）と非小細胞癌（NSCLC）との2つの群に分類される。しかしながら、どちらのタイプでも、複数の臓器への転移が診断時

に高頻度に観察される。骨は、肝臓及び脳に次いで、肺癌患者において3番目に多く転移が見られる臓器である。特に骨転移は、病的骨折、骨髄圧迫、及び高カルシウム血症を誘導することにより様々な重篤な症状を引き起こし、患者の生活の質を低下させる(Iguchi, H.ら, Cancer Res. 56:4040-4043, 1996)。骨転移を起こした患者には症状を軽減するために待期放射線療法が施されるが、これらの患者には予後を改善することができる新規治療法が必要とされている。

【0003】

近年、その分子メカニズムを解明し、治療法を開発するために、ヒト癌細胞を有する骨転移モデルの開発に多くの注目が集まっている。免疫不全マウスに心臓内経路を通じて癌細胞を注射したところ、メラノーマ(Arguello, F.ら, Cancer Res. 48:6876-6881, 1988; Nakai, M.ら, Cancer Res. 52:5395-5399, 1988)、乳癌(Hall, D. G.及びStocia, G., J. Bone Miner. Res. 9:221-230, 1994; Sasaki, A.ら, Cancer Res. 55:3551-3557, 1995)、前立腺癌(Shevrin, D. H.ら, Prostate 19:149-154, 1991)、及び肺癌(Iguchi, H.ら, Cancer Res. 56:4040-4043, 1996)について骨転移を引き起こしたことが報告されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

これらのモデルでは、腫瘍細胞を心臓の左心室に注射し、受容マウスの75%に骨転移が生じた。しかしながら、腫瘍細胞の心臓内注射は技術的に容易とは言えず、ある程度は突然死と関連する。このように、腫瘍細胞を心臓に注射することは動物にとって負担が大きく、倫理的、また経済的な問題を伴っていた。その結果、大きな問題となっている骨転移の抑制及び／または予防のための新規薬剤のスクリーニング方法として、簡便で再現性のよい方法は未だ開発されていなかった。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、腫瘍細胞の骨転移のメカニズム等を解明し、また骨転移の治療及び予防のために有効な薬剤を開発するために用いることができる骨転移モデルを、腫瘍細胞の末梢投与によって作製することに成功した。

【 0 0 0 6 】

本発明者等は、ナチュラルキラー（NK）細胞枯渇SCID（重症複合免疫不全）マウスに静脈内注射したヒト肺癌細胞株8系列について、骨及び複数の臓器における転移結節形成能を調べ、骨転移と副甲状腺ホルモン関連タンパク質（PTHrP）との相関を探った。小細胞癌の細胞株（SBC-5、SBC-3、SBC-3/ADM、H69、H69/VP）は全て、複数の臓器（肝臓、腎臓、及びリンパ節）において転移結節を形成したが、SBC-5細胞だけは増殖的に骨転移を形成した。扁平上皮細胞癌（RERF-LC-A1）細胞は主に肝臓及び腎臓に転移し、一方、腺癌（PC14、A549）は主に肺にコロニーを形成した。X線写真法による検出で、SBC-5細胞によって形成される骨溶解性骨転移は早くて28日目に検出され、受容マウスは全て35日目までに骨転移を引き起こした。8種の細胞株におけるPTHrPの発現は骨転移の形成と直接的に相関していた。骨転移の形成と他の転移関連サイトカイン（IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-11、TNF- α 、VEGF、M-CSF）の発現との間には相関が見られなかった。SBC-5細胞による骨転移の形成と一致するように、マウス血清中のPTHrP及びカルシウムのレベルは時間依存的に増加した。このことは、ヒト肺癌によって産生されるPTHrPが、骨転移及び高カルシウム血症の生起に重要な役割を果たし得ることを示唆している。これらの結果は、SBC-5細胞の骨転移モデルが、様々な臓器の微小環境下での転移過程の分子態様を明らかにし、骨転移を起こした肺癌患者のための治療法を開発するために、有用であり得ることを示している。

上記知見に基づいて更に検討した結果、本発明者等は上記骨転移モデルを用い、骨転移を抑制及び／または予防するための新規薬剤をスクリーニングできること等を見出し、本発明を完成させた。

【 0 0 0 7 】

従って、本発明は以下の（1）～（10）を提供する：

（1） 腫瘍の骨転移を抑制及び／または予防するための物質のスクリーニング方法であって、以下の工程(i)～(iii)：

(i)骨転移を含む腫瘍の多臓器転移を示す非ヒトモデル動物を作製する工程、

(ii)該モデル動物に候補物質を投与する工程、

(iii)骨転移の抑制及び／または予防効果を測定する工程、を含む、上記スクリーニング方法。

【 0 0 0 8 】

(2) 上記非ヒトモデル動物を、骨転移を起こし得る腫瘍細胞を末梢投与により導入することによって作製する、上記(1)に記載の方法。

(3) 上記腫瘍細胞が、PTHrPを高度に発現しているヒト肺癌または乳癌由来細胞である、上記(2)に記載の方法。

【 0 0 0 9 】

(4) 上記腫瘍細胞が、ヒト肺小細胞癌(SCLC)由来の細胞である、上記(2)に記載の方法。

(5) 上記動物がげっ歯類である、上記(1)に記載の方法。

(6) 上記動物がマウスである、上記(5)に記載の方法。

(7) 上記動物が免疫不全マウスである、上記(6)に記載の方法。

(8) 被験物質が、PTHrPアンタゴニスト、抗PTHrP抗体、抗PTHrP抗体アナログ、低分子化合物である、上記(1)に記載の方法。

【 0 0 1 0 】

(9) 腫瘍細胞の骨転移に対する治療の有効性を評価するための方法であって、以下の工程(i)及び(ii)：

(i) 骨転移を含む腫瘍の多臓器転移を示す非ヒトモデル動物に対して治療を施す工程、及び

(ii)骨転移の大きさ及び／もしくは程度、及び／または骨転移が原因で生ずる症状を、対照動物と比較する工程、を含んでなる方法。

【 0 0 1 1 】

(10) 骨転移に対する被験物質の作用を確認するための、骨転移を含む腫瘍の多臓器転移を示す非ヒトモデル動物の使用方法であって、以下の工程(i)及び(ii)：

(i)動物に被験物質を投与する工程、及び

(ii)骨転移の大きさ及び／もしくは程度、及び／または骨転移が原因で生

ずる症状を、対照動物と比較する工程、
を含んでなる使用方法。

【0012】

(11) 腫瘍の骨転移を抑制及び／又は予防するための薬剤を製造するための方法であって、以下の工程(i)及び(ii)：

(i) 請求項1記載のスクリーニング方法により腫瘍の骨転移を抑制及び／又は予防するための物質を同定する工程、

(ii) (i)により同定される物質を製剤上許容される担体と混合する工程、を含む、上記薬剤の製造方法。

(12) 上記物質が、抗PTHrP抗体又は抗PTHrP抗体アナログである上記(11)記載の方法。

【0013】

【発明の実施の形態】

骨転移の形成には様々な可溶性メディエーター、例えば、サイトカイン及び副甲状腺ホルモン関連タンパク質(PTHrP)等が関与することが報告されている。PTHrPは元来、悪性の体液性高カルシウム血症(HHM)を伴う腫瘍に由来する17 kDaのPTH様アデニル酸シクラーゼ刺激タンパク質として同定されたものである(Suva, L. J.ら, Science 237:893-896, 1987; Broadus, A. E.ら, N. Engl. J. Med. 319:556-63, 1988)。興味深いことに、乳癌、前立腺癌、及び肺癌を含む様々な腫瘍細胞が、PTHrPを過剰発現している(Burtis, W. J.ら, N. Engl. J. Med. 322:1106-12, 1990)。近年、高頻度に骨転移を起こす肺癌細胞株がPTHrPを過剰発現することが分かり、抗PTHrP抗体によってヌードマウスを処理することにより骨転移の形成が抑制された(Iguchi, H.ら, Cancer Res. 56:4040-4043, 1996)。このことは、PTHrPがヒト肺癌に由来する骨転移の形成に重要な役割を果たすことを示唆している。

【0014】

近年、本発明者等は、抗IL-2受容体β鎖抗体(TMβ1)を用いたSCIDマウスにおけるNK細胞の枯渇により、各種ヒト肺癌細胞株の静脈内注射によって引き起こされる多臓器転移(肺、肝臓、腎臓、及びリンパ節)の形成が生じることを示し

た (Yano S., 2 本の論文がある)。血液系の癌以外の固形癌では、尾に静脈内注射した癌細胞の骨転移形成能を示す証拠について報告がないので、本発明者等は、NK細胞枯渇SCIDマウスに静脈内注射した異なる 8 系列のヒト肺癌細胞株を用いて、骨転移が生じるか否かについて調べた。さらに本発明者等は、ヒト肺癌細胞株におけるPTHrP及びサイトカインの発現と骨転移の形成との相関をも評価した。

【 0 0 1 5 】

本発明の骨転移モデル動物は、腫瘍細胞の骨転移を示す非ヒト動物をいう。本発明において、「腫瘍細胞の骨転移を示す」とは、その動物において、末梢投与によって導入された腫瘍細胞由来の骨転移を 1 ヶ所以上有することをいう。骨転移の他、肺、肝臓、腎臓、リンパ節等の他の臓器に同時に転移しているものであっても良く、こうした多臓器転移の場合には、骨転移と他の臓器への転移について、薬剤の有効性の検討等を同時に行うことができる。非ヒト動物における骨転移の有無及び程度は、X線写真によって骨吸収像（パンチアウト像）を検出するか、及び／又は組織学的分析によって確認することができるが、骨転移の確認手段は特に限定されるものではない。

【 0 0 1 6 】

本発明において好適に使用できる腫瘍細胞は、末梢投与により骨転移を起こし得るものであって、ヒトを含む種々の動物由来の例えば扁平上皮癌、小細胞癌、腺癌、大細胞癌、腺扁平上皮癌、カルチノイド等の肺癌、非浸潤癌、浸潤癌（浸潤性乳管癌、粘液癌、浸潤性小葉癌、扁平上皮癌、他）等の乳癌、さらにその他癌腫として腎癌、前立腺癌、胃癌、肝癌、大腸癌、脾癌、などが挙げられ、好ましくはPTHrP を高度に発現している細胞が挙げられる。「高度に発現している」とはPTHrPが細胞培養上清にある濃度以上検出される、特にPTHrP-C端を測定する場合は正常人において検出される濃度よりも高濃度であることをいう。または、その腫瘍を移植したヌードマウスなどの非ヒト動物の血中にPTHrPがある濃度以上検出されることをいう。例えば一般的にはPTHrP-N端の測定（例えば三菱化学ビーシーエル）においては1.1pmol/L以上、PTHrP-C端の測定（例えば（株）エスアールエル）においては55.3pmol/L以上の濃度が検出された場合である。更に例

例えば、本願の実施例に記載の方法により細胞培養上清中のPTHrP（C端）を検出した場合に、55.3pmol/L以上、好ましくは100pmol/L以上、より好ましくは300pmol/L以上、更に好ましくは499pmol/L以上検出されることをいう。本発明において特に好適にはヒトSCLC細胞株が利用できる。好適に用いられるヒトSCLC細胞株SBC-3及びSBC-5細胞は、平木博士（岡山大学）から供与を受けたが、一般的にはヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入可能である。多剤耐性SCLC細胞株SBC-3/ADMについては以前に報告されたようにして確立した（Nakamura, K.ら, Cancer Res. 59:5323-5330, 1999）。ヒト肺扁平上皮癌RERF-LC-AI細胞は、秋山博士（放射能影響研究所）から供与を受けたが、一般的には理研セルバンクから購入可能である。ヒト肺腺癌PC-14細胞、ヒトSCLC細胞H69及びそのエトポシド耐性変異体H69/VPは、西條博士（国立ガンセンター）から供与を受けたが、ヒト肺腺癌PC-14細胞は理研セルバンクから購入可能であり、ヒトSCLC細胞H69はATCC(American Type Culture Collection)から購入可能である。

【 0 0 1 7 】

腫瘍細胞の培養は、当分野において通常用いられている方法のいずれを使用しても良く、特に限定しない。例えば、SBC-3、SBC-3/ADM及びSBC-5細胞は、熱不活性化した10%ウシ胎仔血清（GIBCO, Grand Island, NY）、ゲンタマイシン（Schering-Plough, Osaka, Japan）及び4 mM HEPESを添加したイーグルMEM中にて、維持することができる。RERF-LC-AI、PC-14、H69及びH69/VP細胞は、熱不活性化した10%ウシ胎仔血清及びゲンタマイシンを添加したRPMI 1640培地（CRPMI 1640）中にて維持することができる。細胞株は全て、好ましくは空気中に5% CO₂を含む湿潤雰囲気中、37℃にてインキュベートを行う。

【 0 0 1 8 】

動物に移植する細胞の調製は以下のように行う。回収した腫瘍細胞を、例えばCa²⁺及びMg²⁺を含まないリン酸緩衝化生理食塩水（CMF-PBS）により洗浄する。細胞の生存率は、トリパンブルー排除試験によって測定することができ、好ましくは、90%を上回る生存率を示す単一細胞懸濁液だけを使用する。

【 0 0 1 9 】

本発明において、非ヒト動物としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモ

ット、ウサギ、ブタ、ミニブタ、ヒツジ、ネコ、イヌ等の哺乳動物、ニワトリ等の鳥類、及び魚類等の脊椎動物を挙げることができるが、ヒト以外であればいずれでも良く、特に限定されるものではない。本発明において、飼育及び操作上の点から、好ましくはマウス、ラット、ハムスター等のげっ歯類、特に好ましくはマウスである。マウスとしては、当分野において通常使用される種類のマウスであればいずれも好適に使用することができる。例えば、オスのC.B-17/IcrCrj-sc idマウス（6-8週齢）は、日本チャールスリバー株式会社（神奈川、横浜）から入手することができ、実験を通じて特定の病原体を含まない条件下で維持することが可能である。

【 0 0 2 0 】

本発明の骨転移モデル動物を作製する場合、正常な動物から作製しても良いが、免疫不全動物であれば特に好適な結果が得られる。免疫不全動物は、当分野において公知の手段によって入手又は作製することができ、例えばSCIDマウスの場合には日本クレア株式会社（東京、目黒）や日本チャールスリバー株式会社（神奈川、横浜）より購入することができる。

【 0 0 2 1 】

本発明において、末梢投与とは、直接生体内へ薬物等を投与する非経口投与をいい、例えば静脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与等をいい、経皮、吸入、脳内、点眼等の投与形態を含まない。

本発明の骨転移モデル動物は、例えば以下のようにして作製することができる。

【 0 0 2 2 】

(i) 免疫力が低下した非ヒト動物を準備する工程

異種の細胞（腫瘍）を動物に移植する場合、宿主の免疫機能を低下（不全）させることが必要である。一般的に腫瘍を移植する免疫不全モデルとしてはヌードマウス（胸腺欠如でT細胞機能が欠如したマウス）やSCIDマウス（T細胞に加えB細胞の機能が欠如したマウス）が使用されている。しかし、これらのモデルにおいてNK細胞は機能しており、より腫瘍の生着を確実にするにはこのNK細胞を不活化する必要がある。その手段としてアシアロGM1抗体またはここで使用しているTM

$\beta 1$ で処理する方法を用いることが好ましい。

【 0 0 2 3 】

また、もう一つの方法として、マウスの全身にX線照射をして免疫抑制マウスを作製することも行われている。

免疫不全の動物としては一般的に入手可能なヌードマウス、SCIDマウス、またはヌードマウスやSCIDマウスにアシアロGM1抗体やTM $\beta 1$ を投与したマウス、さらにX線照射マウスなどが挙げられる。

【 0 0 2 4 】

ヒト肺癌細胞株の転移を促進するためには、ナチュラルキラー（NK）細胞をSCIDマウスにおいて枯渇させることが好ましい。このNK細胞の枯渇は、例えばSCIDマウスを抗IL-2受容体抗体、特に抗IL-2受容体 β 鎖抗体（TM $\beta 1$ ）で処理することにより引き起こすことができる。抗体はヒトを含むいずれの動物由来のものであっても良いが、特に好ましくはマウス抗体である。抗マウスIL-2受容体 β 鎖モノクローナル抗体であるTM- $\beta 1$ （IgG2b）は、宮坂博士及び田中博士（大阪大学）から供与を受けたが、特許第3040451号に記載の方法により作製することができる（14）。例えば、腫瘍注射の2日前に、SCIDマウスにTM- $\beta 1$ Ab（1mg/1ml PBS/匹）を腹腔内注射すればよい（Yano, S.ら, Int. J. Cancer 67:211-217, 1996）。

【 0 0 2 5 】

(ii)非ヒト動物に末梢投与により骨転移を起こし得る腫瘍細胞を導入する工程

末梢投与による腫瘍細胞の導入は、好ましくは注射、特に好ましくは静脈内注射によって行う。0.3 mlの腫瘍細胞（およそ $1 \sim 5 \times 10^6$ 個）を、TM- $\beta 1$ Abで前処理した非麻酔状態のSCIDマウスの側方尾静脈に注射すればよい。所定の時間経過後、骨転移をX線写真法（Fuji Film, Tokyo, Japan）により評価することができる。内臓転移を検出するために、マウスを犠牲にし、肺、肝臓、腎臓及びリンパ節の転移部位の数を肉眼で計測する。

組織病理学的研究では、標準的方法により、回収した動物の主たる臓器を10%リン酸緩衝化ホルマリン中に固定し、切片化し、ヘマトキシリン及びエオシンで染色すれば良い。

【 0 0 2 6 】

本発明のスクリーニング方法は、上記のようにして作製した骨転移を含む腫瘍の多臓器転移を示す非ヒトモデル動物に、次いで骨転移抑制及び／または予防のための候補物質となる被験物質を投与する。被験物質は特に限定されず、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、細胞内の種々の因子等が挙げられるが、抗PTHrP抗体が骨転移を抑制することが確認されていることから、例えばPTHrPアンタゴニスト、抗PTHrP抗体、抗PTHrP受容体抗体、抗PTHrP抗体アナログ、低分子化合物等が好ましいものとして挙げられる。PTHrPアンタゴニストとは、腫瘍細胞によって過剰発現されるPTHrPあるいはPTHrP受容体と結合してPTHrPの作用を阻害したり、代謝を促進したりするものが挙げられる。抗PTHrP抗体アナログとしては、例えば抗体の断片や遺伝子組換え技術により改変された抗体等が挙げられ、また低分子化合物としては、例えばPTHrP(7-34)等が挙げられる。被験物質の投与は、経口投与、または静脈注射、皮下注射、腹腔内注射、筋肉内注射等を含む非経口投与の従来知られている局所及び全身投与の方法の何れを用いても良く、用いる動物の種類や骨転移の程度等に応じて適宜選択することができる。投与量及び投与時期については動物及び被験物質の種類、骨転移の程度等に応じて適宜選択することができる。

【 0 0 2 7 】

被験物質を投与した後、該被験物質による骨転移の抑制及び／または予防効果を測定する。測定は、例えば骨転移の大きさ及び／もしくは程度、及び／または骨転移が原因で生ずる症状を、対照動物と比較することによって行うことができる。具体的には、X線写真で測定することが好ましい。対照動物としては、上記投与を行わない以外は同じ条件においた動物を意味するが、場合によっては上記投与前の同じ動物であっても良い。

【 0 0 2 8 】

本発明はまた、腫瘍細胞の骨転移に対する治療の有効性を評価するための、以下の工程(i)及び(ii)を含む方法を提供する：

(i)上記の非ヒト骨転移モデル動物に治療を施す工程、及び

(ii)骨転移の大きさ及び／もしくは程度、及び／または骨転移が原因で生じる症状を、対照動物と比較する工程。

【 0 0 2 9 】

ここで、「治療」とは薬剤による治療の他、放射線療法等の治療を含み、更に骨転移の予防（拡大防止等）を含む。治療が有効である場合には、骨転移の縮小または消失、あるいは拡大の防止が見られ、また骨転移によって生じる麻痺等の症状の軽減等が見られる。対照動物としては、上記治療を行わない以外は同じ条件においた動物を意味するが、場合によっては上記治療前の同じ動物であっても良い。

【 0 0 3 0 】

さらに、本発明は、上記の非ヒト骨転移モデル動物の、骨転移に対する被験物質の作用を確認するための使用方法であって、以下の工程(i)及び(ii)を含む使用方法を提供する：

(i)動物に被験物質を投与する工程、及び

(ii)骨転移の大きさ及び／もしくは程度、及び／または骨転移が原因で生じる症状を、対照動物と比較する工程。

ここで、被験物質は特に限定されず、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、細胞内の種々の因子等が挙げられる。被験物質の投与は、経口投与、または静脈注射、皮下注射、腹腔内注射、筋肉内注射等を含む非経口投与の従来知られている局所及び全身投与の方法の何れを用いても良く、用いる動物の種類や骨転移の程度等に応じて適宜選択することができる。あるいはまた、細胞内の特定の因子を除くか、その機能を低下させることによって、正常な状態がその特定の因子を投与した条件になるようにすることもできる。このような使用によって、被験物質が薬剤として有効であるか否かが判定できる。

【 0 0 3 1 】

本発明の腫瘍の骨転移を抑制及び／又は予防するための物質を有効成分として含有する薬剤は、常法にしたがって製剤化することができ（Remington' s Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

【 0 0 3 2 】

このような担体及び医薬添加物の例としては、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアシルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

【 0 0 3 3 】

実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせで選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合は、精製された骨転移を抑制及び／又は予防するための物質を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween80、Tween20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤型とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

【 0 0 3 4 】

上記の通り、本発明者等は腫瘍細胞の静脈内注射によって新規の骨転移モデル動物を確立し、該モデルを用いて骨転移の抑制及び／または予防のための新規薬剤のスクリーニング、新規治療法の開発を可能とした。

複数の骨転移を有するマウスは神経障害（後肢の両肢麻痺または片肢麻痺）及び高カルシウム血症を呈した。これらは骨転移を起こした肺癌患者に高頻度に見られるものであり、このことは、本発明者等の骨転移モデルがヒトの肺癌の骨転移の特徴を再現していると考えられることを示唆している。

【 0 0 3 5 】

本発明において用いたモデルが従来のもものよりも有利な点としては、1)骨転移の発生率が100%であること、2)転移形成を促進するためには免疫不全動物が好

ましいとはいふものの、必要な手順は容易であること、3)内臓転移も再現性良く形成されるため、様々な臓器において薬剤の抗転移作用を1つのモデルで評価することができること、が挙げられる。

【 0 0 3 6 】

骨転移の形成はいくつかの段階からなり、骨髄中の毛細血管での腫瘍細胞停止 (arrest)、管外遊出、骨再吸収による腫瘍細胞侵入、及び腫瘍増殖を含む。したがってこれらの段階をモジュレートする各種のサイトカインが骨転移形成を促進し得る。前炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF- α)は、骨再吸収及び毛細血管で発現される接着分子の発現をアップレギュレートし、また前血管形成サイトカイン(VEGF及びIL-8)は血管新生を誘導し得る。さらに、M-CSF及びIL-10は、それぞれマクロファージ及びリンパ球を活性化し、腫瘍増殖を抑制することができる(Yano, S.ら, Cancer Res. 57:784-790, 1997; Giovarelli, M.ら, J. Immunology 155:3112-3123, 1995)。それにもかかわらず、使用したヒト肺癌細胞におけるこれらのサイトカインの発現と骨転移形成との間には相関がなかった。

【 0 0 3 7 】

近年、一次腫瘍におけるPTHrPの発現が、乳癌患者の骨転移発生率と直接相関していることが報告された(Powell, G. J.ら, Cancer Res. 51:3059-3061, 1991)。さらに、乳癌または前立腺癌の患者で、骨転移においてPTHrPの発現が高レベルに検出された(Bundred, N. J.ら, Eur. J. Cancer 28:690-692, 1992; Bouizara, Z.ら, Cancer Res. 53:5076-5078, 1993)。これらの報告と一致するように、高レベルにPTHrPを発現している細胞は、NK細胞枯渇SCIDマウスにおいて骨転移を引き起こす可能性が非常に高い。したがって、骨再吸収を刺激するPTHrPは、本発明で用いるモデルにおける骨転移形成においても重要な役割を果たしているであろう。

【 0 0 3 8 】

高カルシウム血症は肺癌患者において高頻度に観察される。これは2つの異なるメカニズムにより引き起こされ得る。すなわち、HHMとLOH(局所骨溶解性高カルシウム血症)である(Burtis, W. J.ら, N. Engl. J. Med. 322:1106-12, 1990)。HHMは、腫瘍細胞によって産生されるPTHrPにより媒介される。PTHrPは、間接

的に、破骨細胞による骨再吸収を刺激し、また腎臓のカルシウム再吸収を増加させるため、血清中のカルシウムレベルが上昇する。LOHでは、腫瘍細胞により局所的に産生されるサイトカイン(IL-1、IL-6、TNF- α)が破骨細胞系列(linage)細胞の増殖及び分化を促進し、骨再吸収を誘導し、それにより高カルシウム血症を引き起こす(Mundy, G. R., Bone, 12(supple) S1-S6, 1991; Yoneda, T., M. Noda(編), Cellular and molecular biology of bone, 375-412, New York, Academic Press, 1993; Jilka, R. L.ら, Science 257:88-91, 1992; Roodman, G. D., Calcif. Tissue Int. 53, S94-S98, 1993; Tamura, T.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11924-11928, 1993; Kurihara, N.ら, J. Immunology 144:4226-4230, 1990; Tashjian, Jr A. H.ら, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:4535-4538, 1985; Oreffo, R. O.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 158:817-823, 1989)。本発明の研究では、SBC-5細胞注射SCIDマウスにおいて高カルシウム血症が時間依存的に観察された。腫瘍細胞は、タンパク質のレベルでもmRNAのレベルでも、高度にPTHrPを発現したが、一方IL-1、IL-6またはTNF- α は細胞の培養上清中に検出されなかった。このことは、これらの細胞を注射したマウスにおいて観察される高カルシウム血症が、これらの細胞により産生されるPTHrPによるものである可能性(HHMメカニズム)を示唆している。

【 0 0 3 9 】

骨転移によって引き起こされる徴候としての麻痺が、SBC-5細胞を注射したマウス全てに起こったという本発明の知見は、興味深いものであった。それにもかかわらず、SBC-3、SBC-3/ADM、H69、またはH69/VPを有するマウスでも麻痺は低い発生率(10~60%)で観察されるが、放射線透過性病変(骨溶解性骨転移の特質である)はX線写真で検出できなかった。このことは、これらのマウスでは脳または脊髄への転移を伴っている可能性を示唆している。

【 0 0 4 0 】

多臓器転移の形成は肺癌患者の管理において重大な問題である。この研究において、試験したヒト肺癌細胞株8系列全てがNK細胞枯渇SCIDマウスにおいて多臓器転移を引き起こした。興味深いことに、腺癌細胞株2系列は主に肺で転移を引き起こし、一方小細胞癌細胞株5系列は主に肝臓、腎臓、及び全身のリンパ節で

病変を生じたが、それらの臨床的挙動はよく似ていた。本発明者等は、臓器特異的な転移の原因となる主要分子を同定すべく、これらの細胞株における各種サイトカインの発現を調べたが、サイトカインの発現と転移の可能性との間には相関がみられなかった。試験した 8 細胞株のうち SBC-5 は、PTHrP を過剰発現し、骨転移以外にも複数の内臓器官（例えば肺、肝臓、腎臓、及び全身のリンパ節）に最も積極的に転移を引き起こした。最近の報告では、ヒト前立腺癌細胞に PTHrP 遺伝子をトランスフェクションすると、アポトーシス刺激に抵抗し、in vivo で腫瘍増殖を促進した (Dougherty, M. K. ら, Cancer Res. 59:6015-6022, 1999)。したがって、PTHrP は骨だけでなく内臓器官に対しても SBC-5 細胞の転移形成を促進し得る。

【 0 0 4 1 】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されることを意図するものではない。尚、本実施例において用いた物質は、リムルス・アメボサイト (limulus amoebocyte) アッセイ (生化学工業: 最低検出レベル 0.1 ng/ml) による確認では、エンドトキシンを含まなかった。

【 0 0 4 2 】

実施例 1

NK 細胞枯渇 SCID マウスにおけるヒト肺癌細胞株により生ずる転移のパターン

NK 細胞枯渇 SCID マウスにおける異なる 8 系列のヒト肺癌細胞株により生ずる多臓器転移のパターンを調べた。NK 細胞枯渇 SCID マウスに $1-5 \times 10^6$ 個の腫瘍細胞をマウスの尾静脈から静脈内注射し、所定の期間経過後に該マウスを犠牲にし、肺、肝臓、腎臓、及びリンパ節中の転移コロニー数を計測した。受容マウスは全て腫瘍病変を生じ、マウスの大部分は犠牲時まで病的状態となっていた。

【 0 0 4 3 】

【表 1】

ヒト肺癌細胞株により生じる転移のパターン

細胞株	測定日 (Day of Sacrifice)	転移の数 ; 中間値 (範囲)			
		骨	肺	肝臓	腎臓 リンパ節
扁平上皮癌 RERF-LC-AI ^a	day 42	All 0	All 0	67(38->100)	19(15-30) 4(0-18)
腺癌 PC-14 ^a	day 28	All 0	>100	3(1-7)	5(3-13) 1(0-3)
A549 ^a	day 56	All 0	>100	1(0-2)	All 0 10(4-14)
小細胞癌 SBC-5 ^a	day 35	6(4-9)	31(9-38)	58(32-84)	6(3-20) 3(1-4)
SBC-3 ^a	day 42	All 0	All 0	12(7-21)	12(10-17) 13(6-22)
SBC-3/ADM ^a	day 35	All 0	All 0	54(41-58)	1(0-2) 4(2-7)
H69 ^b	day 56	All 0	All 0	2(1-3)	6(2-12) 32(23-43)
H69/VP ^b	day 56	All 0	All 0	15(9-16)	19(17-25) 21(10-28)

^a ; 1×10^6 個の細胞を注射 ^b ; 5×10^6 個の細胞を注射

【 0 0 4 4 】

扁平上皮癌(RERF-LC-AI)細胞は、主に肝臓及び腎臓に転移コロニーを生じた。腺癌PC-14及びA549細胞は、主に肺に転移を起こした。小細胞癌細胞株5系列のうち4系列(SBC-3、SBC-3/ADM、H69及びH69/VP)が、主に肝臓、腎臓、及び全身のリンパ節に転移を生じた。これらの細胞株のうち、小細胞肺癌の1細胞株(

SBC-5) だけが、骨と、他の臓器（例えば肺、肝臓、腎臓、及び全身のリンパ節）とに転移を生じた。時には、SBC-5の骨転移を起こした受容マウスに麻痺（後肢の両肢麻痺または片肢麻痺）が観察された。

【 0 0 4 5 】

実施例 2

SBC-5細胞により生ずる骨転移のX線解析及び組織学的分析

実施例 1 で得た骨転移をX線写真で検出した。SBC-5細胞を静脈内注射したマウスにおいては複数の骨転移が再現性良く生じ、骨転移病変がX線写真上に放射線透過性病変として検出された（図1A）。これは、主に骨椎（図1B）及び四肢の骨（図1C）の骨溶解性骨転移を示す。組織学的分析は、これらの病変が多核細胞を伴う腫瘍細胞からなることを示している（図2A及び2B）。これらの病変を有するマウスは後肢の麻痺及び膀胱拡大を伴う尿閉を有していた。これは、おそらく骨転移により引き起こされる脊髄の病的骨折及び／または圧迫が原因である。

【 0 0 4 6 】

実施例 3

NK細胞枯渇SCIDマウスにおける骨転移に対する腫瘍細胞数の影響

骨転移のための最適実験条件を決定するために、NK細胞枯渇SCIDマウスに様々な数のSBC-5細胞を注射した。マウスが病的状態に陥ると、マウスを犠牲にし、骨転移の数をX線写真で測定した。内臓器官についての数は肉眼で測定した。内臓転移と同様に、骨転移の数は、注射した細胞数に依存した（表 2）。これらの結果に基づき、この後の実験では 1×10^6 個のSBC-5細胞を注射した。

【 0 0 4 7 】

【表 2】

SBC-5細胞により生じる多臓器転移のパターン

細胞数	測定日 (Day of Sacrifice)	骨			肺			肝臓			腎臓			リンパ節		
		Inc. ^a	Med ^b	範囲	Inc.	Med ^b	範囲	Inc.	Med ^b	範囲	Inc.	Med ^b	範囲	Inc.	Med ^b	範囲
1 × 10 ⁵	121	3/5	3	0-6	0/5	0	All 0	5/5	30	7-45	0/5	0	All 0	2/5	3	0-5
5 × 10 ⁵	49	5/5	6	1-8	2/5	3	0-10	5/5	25	14-50	3/5	2	0-4	3/5	2	0-3
1 × 10 ⁶	35	5/5	4	2-5	5/5	5	3-18	5/5	47	25-58	5/5	2	1-3	5/5	2	1-3
2 × 10 ⁶	35	5/5	4	3-6	5/5	11	9-24	5/5	49	33-84	5/5	9	7-10	5/5	3	2-5

^a ; Inc., 発生率 ^b ; Med., 中間値

【 0 0 4 8 】

実施例 4SBC-5細胞により生じた骨転移及び内臓転移の時間的動態

SBC-5細胞による骨転移形成の動態を調べた。25匹のNK細胞枯渇SCIDマウスに 1×10^6 個のSBC-5細胞を静脈内注射し、骨転移の形成を10、14、21、28及び35日目にX線写真で測定した。各時点で4～5匹のマウスを犠牲にし、内臓器官転移を測定した。骨転移は早くて28日目に検出され、35日目には全ての受容マウスで観察された（表3）。骨転移形成と一致するように、体重の減少が早くて28日目に観察された（表4）。一方、肺及び肝臓への転移は21日目までに生じ、腎臓及びリンパ節への転移は28日目までに生じた。35日目には、全てのマウスが複数の臓器（例えば、肺、肝臓、腎臓、及びリンパ節）に転移病変を生じた。尚、マウス血清中のカルシウムレベルは、発光物質としてメチルキシルエノールブルー（大塚製薬）を用いて測定した。

【 0 0 4 9 】

【表 3】

SBC-5細胞により生じる多臓器転移の時間的動態

測定日 (Day of Sacrifice)	骨			肺			肝臓			腎臓			リンパ節		
	Inc. ^a	Med ^b	範囲	Inc.	Med	範囲	Inc.	Med	範囲	Inc.	Med	範囲	Inc.	Med	範囲
10	0/25	0	All 0	0/4	0	All 0	0/4	0	All 0	0/4	0	All 0	0/4	0	All 0
14	0/21	0	All 0	0/4	0	All 0	0/4	0	All 0	0/4	0	All 0	0/4	0	All 0
21	0/17	0	All 0	4/4	18	1-21	4/4	6	5-8	0/4	0	All 0	0/4	0	All 0
28	8/13	2	0-4	5/5	17	8-34	5/5	57	34-87	5/5	5	3-13	2/5	1	0-2
35	8/8	6	4-9	8/8	31	9-38	8/8	58	32-84	8/8	6	3-20	8/8	3	1-4

^a : Inc., 発生率 ^b : Med., 中間値

【 0 0 5 0 】

【表 4】

SBC-5細胞を注射したNK細胞枯渇SCIDマウスの体重、
カルシウム及びPTHrPレベルの動態

測定日 (Day of Sacrifice)	体重 (g)		Ca (mg/dl)		PTHrP (pmol/l)	
	Med.	範囲	Med.	範囲	Med.	範囲
10	21.57	20.1-23.8	8.0	8.0-8.2	24.1	<10.0-63.2
14	22.50	21.2-23.8	9.2	9.0-10.4	88.2	26.3-143
21	21.92	21.7-26.0	9.6	9.2-10.5	95.3	<10.0-115
28	18.64	16.6-21.3	9.9	9.0-10.2	299.0	146-527
35	16.00	13.3-18.4	12.0	9.5-15.0	544.3	317-1020

【 0 0 5 1 】

実施例 5

ヒト肺癌細胞株におけるPTHrP及び転移関連分子の発現

PTHrP及びIL-11は骨再吸収及び骨転移において重要な役割を果たしていることが報告されている(20-27)。本発明者等はヒト肺癌細胞株におけるPTHrP及びIL-11の発現と骨転移を生ずる可能性とが相関しているか否かを判定した。腫瘍細胞(5×10^5 個)細胞をCRPMI 1640中で24時間インキュベートし、上清を回収した。培養上清及びマウス血清中のPTHrPのレベルは、ラジオイムノアッセイを用いて測定できる(大塚製薬)。培養上清中のサイトカイン(VEGF、IL-6、IL-8、IL-10、M-CSF)のレベルはELISAにより測定した(大塚製薬)。

【 0 0 5 2 】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)解析を以下のように行った。製造業者の説明書に従ってRNA LA PCR Kit(宝酒造)を用いて、反応混合液 $20 \mu\text{l}$ 中、 $1 \mu\text{g}$ の全RNAから第一鎖cDNAを合成した。合成した第一鎖cDNA($20 \mu\text{l}$)は、 $1 \times$ LA PCR Buffer II、 2.5 mM MgCl_2 、各プライマー 20 pmol 、及びTaKaRa LA Taq polymerase RNA LA PCR Kit(宝酒造) 2.5 U を含む最終容量 $100 \mu\text{l}$ 中で、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。使用したPTHrPプライマーの配列は、センス鎖用が5'-ATG CAG CGG AGA GAC TGG TTC AG-3'(配列番号1)及びアンチセンス鎖用が5'-TCA ATG CCT CCG TGA ATC GAG CTC CAG AGC CGT-3'(配列番号2)であった(15)

。PTHrP cDNAのPCR増幅は、以下の条件下で行った：94℃で30秒、58℃で30秒、72℃で30秒、を30サイクル。第1サイクルの前に、94℃で2分の変性ステップを含め、また30サイクルの後に伸長を72℃で7分延長した(15)。用いたIL-11プライマーの配列は、センス鎖用が5'-ACT GCT GCT GCT GAA GAC TCG GCT GTG A-3' (配列番号3)及びアンチセンス鎖用が5'-ATG GGG AAG AGC CAG GGC AGA AGT CTG T-3' (配列番号4)である(16)。IL-11 cDNAのPCR増幅は、以下の条件下で行った：94℃で30秒、58℃で30秒、72℃で45秒、を40サイクル。第1サイクルの前に、94℃で2分の変性ステップを含め、また30サイクルの後に伸長を72℃で3分延長した(16)。PCR産物は1.5%アガロースゲル電気泳動によって分析し、エチジウムブロマイド染色によりUV光で可視化した。

【 0 0 5 3 】

その結果、試験した8系列の細胞株は全てIL-11 mRNAを発現したが、8細胞株間でIL-11 mRNA発現に区別できるような差異はなかった(図3)。一方、8細胞株のうち6系列はPTHrP mRNAを発現し、SBC-5細胞では最も強力な発現が観察された。mRNA発現と一致するように、SBC-5細胞は他の細胞株と比較して10倍を上回る高いレベルでPTHrPタンパク質を分泌した(表5)。このことは、PTHrP発現とヒト肺癌細胞における骨転移との直接的な関連を示している。

【 0 0 5 4 】

【表5】

ヒト肺癌細胞株によるサイトカイン産生

	PTHrP ^a	VEGF ^b	IL-6 ^b	IL-8 ^b	M-CSF ^b	IL-10 ^b
RERF-LC-AI	<10	1142	67	1025	454	<20
PC-14	15.1	11429	106	236	911	<20
A549	30.8	743	<20	576	89	<20
SBC-5	499	2040	<20	<20	<20	<20
SBC-3	19.6	1106	<20	13061	297	<20
SBC-3/ADM	14.4	1591	<20	16502	310	<20
H69	<10	3344	<20	<20	<20	<20
H69/VP	<10	3273	<20	<20	<20	<20

^a ; 1 0 pmol/L ^b ; pg

示したデータは3組の独立した実験の結果である。

【0055】

実施例 6

SBC-5細胞を有するマウスの血清中のPTHrP及びカルシウムレベル

PTHrPはHHMにおいて高カルシウム血症の原因となることが報告されている。本発明者等は、SBC-5細胞を有するマウスの血清中のPTHrP及びカルシウムレベルを評価した。血清のカルシウム及びPTHrPのレベルは時間依存的に増加した。このことは、骨転移（または腫瘍量）とこれらのマーカーのレベル及び体重減少との直接的相関を示している（表4）。これらの現象は骨転移を起こしたヒト肺癌の臨床患者を反映したものである。

【0056】

実施例 7

肺癌細胞の、骨転移に関連したサイトカインの産生能

肺癌細胞の骨転移関連サイトカイン（例えばIL-1 α 、IL-6、TNF- α 、IL-10、M-CSF、VEGF及びIL-8）産生能を調べた。8細胞株はこれらのサイトカインを様々なレベルで分泌したが（表5）、このサイトカインの発現レベルと骨転移の形成との間には相関がなかった。

【0057】

実施例 8

癌多臓器転移モデル動物での薬効試験

ヒト小細胞肺癌株をSCIDマウスに移植することで骨を含むいろいろな臓器で腫瘍の増殖が見られる癌多臓器転移モデル動物を用いて、PTHrPに対するマウスモノクローナル抗体（以下単に抗PTHrP抗体と表記）の癌転移に対する効果を検討した。

【0058】

モデル動物としてヒト小細胞肺癌株SBC-5を尾静脈より移植したSCIDマウスを用いた。SBC-5を移植されたマウスは、上記のように肺、肝臓、腎臓、リンパ節などさまざまな臓器に腫瘍の増殖が認められ、腫瘍結節が観察できる。また骨組織にも腫瘍の増殖は認められるが、この場合には腫瘍増殖部位で骨吸収が起こる

ためX線撮影によっていわゆるパンチアウト像が観察できる。ここではSBC-5移植癌多臓器転移モデルの癌転移に対する抗PTHrP抗体の治療効果を肺、肝臓、腎臓、リンパ節での腫瘍結節数および骨組織でのパンチアウト数を指標として評価した。

【0059】

モデル動物の作製は以下のように行った。SBC-5は10%のFBSを添加したEMEMを用いて通常の細胞培養によって維持した。(マウスはSCIDマウスを用いた。) TM- β 1抗体で処理しNK細胞を除去したマウスに 1×10^6 個の細胞を尾静脈より移植することでモデル動物を作製した。

【0060】

抗PTHrP抗体の薬効は以下のように検討した。実験群は5群設定し、対照群と抗PTHrP抗体の投与開始時期を変えた4処理群とした。投与は細胞移植日を0日目として-1、7、14、21、28日目に抗PTHrP抗体(200 mg/匹)あるいは陰性対照としてPBSを尾静脈内に行った。4処理群の抗PTHrP抗体の投与日は、(i)-1、7、14、21、28日目、(ii)7、14、21、28日目、(iii)14、21、28日目、(iv)21、28日目とし、抗PTHrP抗体を投与しない投与日にはPBSを投与した。35日目にマウスを解剖し、形成された腫瘍結節の数を数えた。また、マウスの全身をX線撮影し、パンチアウトの数を数えた。

【0061】

その結果、抗PTHrP抗体を行った群は対照群に比べて骨でのパンチアウト数が減少していた(図4 a)。この効果は抗PTHrP抗体の投与開始が早い群でより顕著であった。その他の臓器では形成された腫瘍結節数に変化は認められなかった(図4 b-e)。このことから、抗PTHrP抗体は癌骨転移の治療あるいは予防に有用であることが示された。

【0062】

【発明の効果】

以上詳述したように、本発明者等は腫瘍細胞を静脈内注射することにより播種した骨転移モデルを確立した。このモデルは、腫瘍細胞が受容マウスにおいて骨溶解性骨病変(麻痺の原因となる)と共に多臓器転移を起こし、また高カルシウ

ム血症を引き起こすことから、ヒトの小細胞肺癌の特徴をよく模擬している。さらに、本発明者等のデータは、腫瘍細胞により分泌されたPTHrPが、骨転移及び高カルシウム血症の経過において重要な役割を果たしていることを示している。したがって、本発明者等の開発した骨転移モデルを用いて、骨転移の抑制及び／または予防のための新規薬剤を簡便にスクリーニングすることが可能であると共に、骨転移の生物学的現象を解明し、骨転移を含む多臓器転移を起こした肺癌患者に対する新規の治療法を開発するためにも有用である。

【 0 0 6 3 】

従来、骨転移モデル動物の作製は、肺癌、乳癌等の骨転移を起こしやすい癌細胞をヌードマウス等の免疫不全マウスの左心室に注射することにより行われていた(Iguchiら, Cancer Res. (1996) 56:4040-4043)。しかし、この方法は侵襲性が大きく、癌細胞移植時の侵襲によりマウスが死亡してしまうなど、経済的な負担が大きかった。また、骨転移抑制剤の効果を確認する際にも、癌細胞移植時の侵襲があるため、薬剤の投与量、投与時期が限定されるなど、広範な骨転移抑制剤のスクリーニングには適していなかった。本発明の方法は、腫瘍細胞を末梢投与によって導入するため、導入操作自体によって動物が死亡してしまうことがなく、経済的であり、更に必要以上に動物を犠牲にすることがないため、倫理的観点からも好ましい方法である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAISEIYAKU KABUSIKIGAISSYA

<120> A Method for Screening Substances Capable of Inhibiting Bone Metastasis of Tumor Cells

<130> P01-0360

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PTHrP primer

<400> 1

atgcagcggg gagactgggtt cag

23

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PTHrP primer

<400> 2

tcaatgcctc cgtgaatcga gctccagagc cgt

33

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: IL-11 primer

<400> 3

actgctgctg ctgaagactc ggctgtga

28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: IL-11 primer

<400> 4

atggggaaga gccagggcag aagtctgt

28

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 : PTHrPプライマー

配列番号 2 : PTHrPプライマー

配列番号 3 : IL-11プライマー

配列番号 4 : IL-11プライマー

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の骨転移モデルマウスのX線写真を示す。1Aは、主に脊椎（1B）及び四肢の骨（1C）において引き起こされた骨溶解性骨転移を示す。

【図 2】

骨転移の組織学的分析を示す。骨転移病変は多核細胞を伴った腫瘍細胞からな

る（2A及びB）。

【図 3】

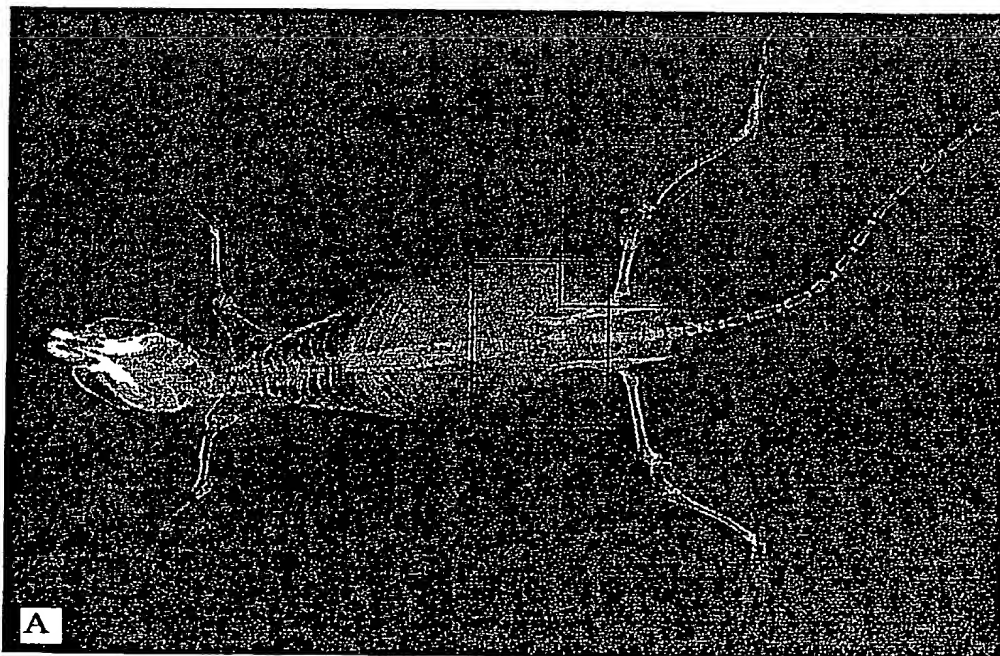
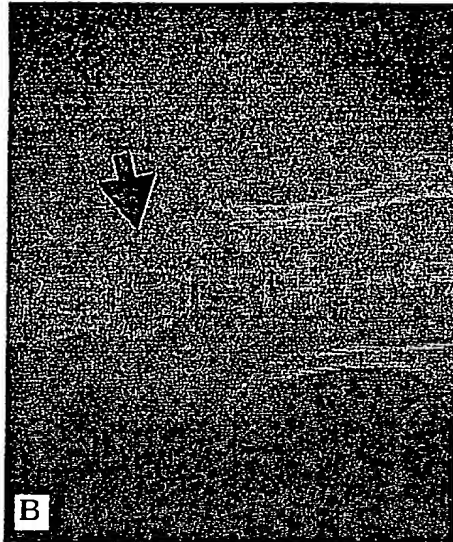
各種腫瘍細胞におけるPTHrP及びIL-11のmRNA発現を示す。

【図 4】

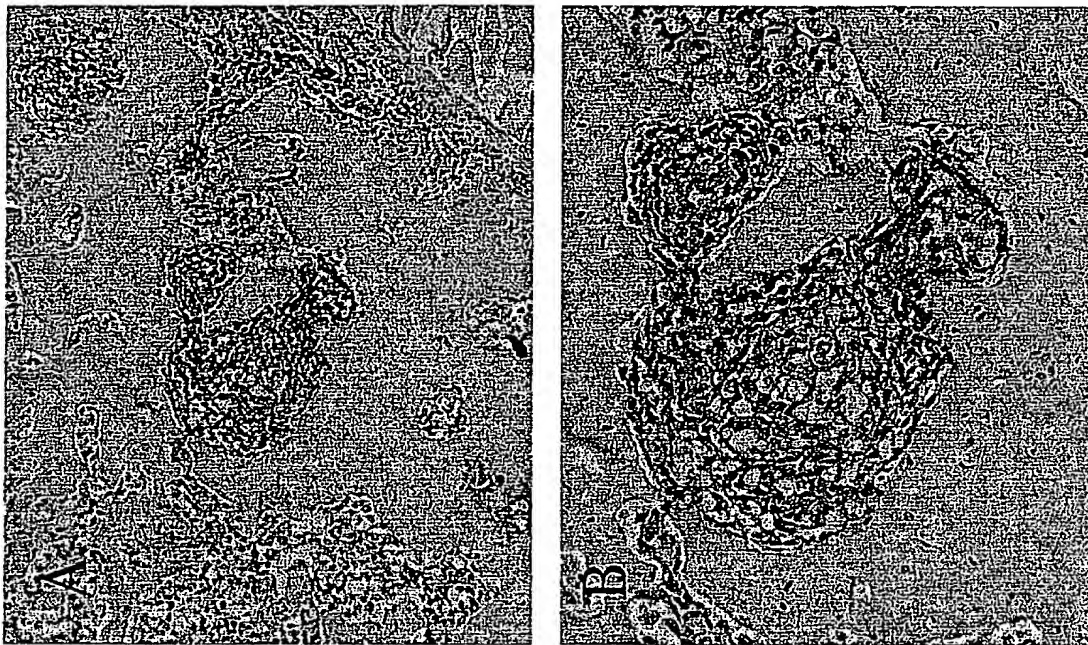
多臓器転移モデル動物における骨、及び肺、肝臓、腎臓及びリンパ節への転移に対する抗PTHrP抗体の効果を示す。

【書類名】 図面

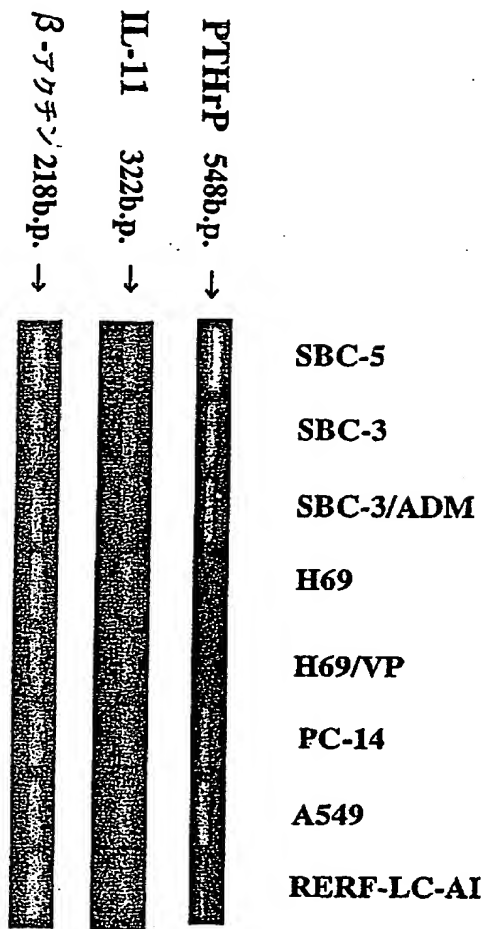
【図1】



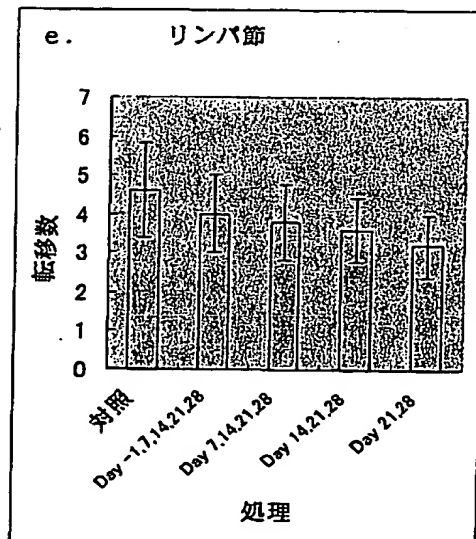
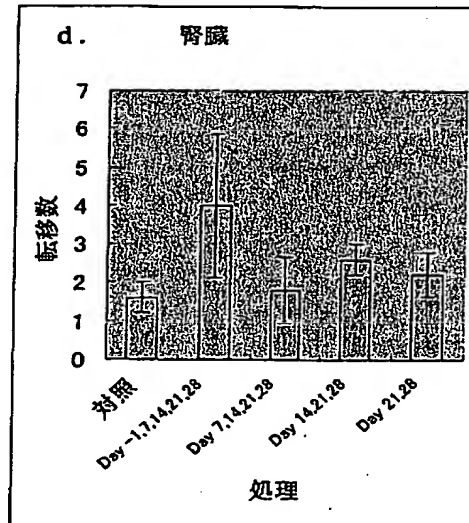
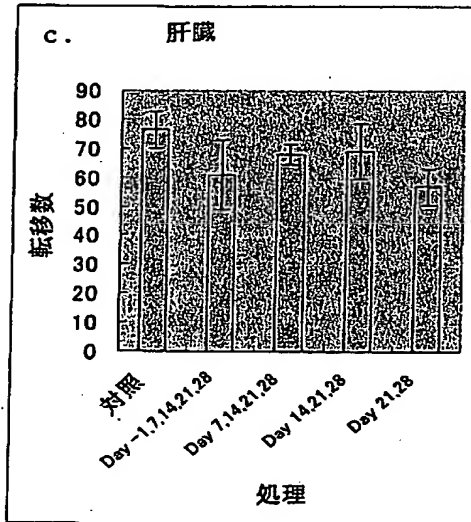
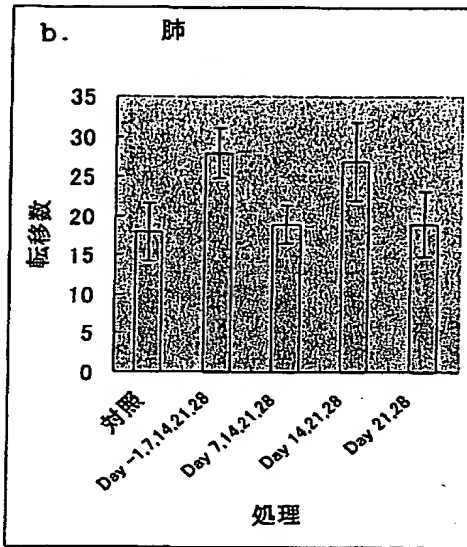
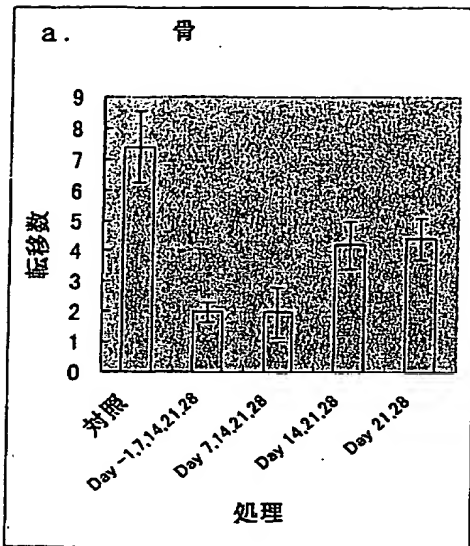
【図2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 骨転移の抑制及び／または予防のための新規薬剤の簡便なスクリーニング方法の開発。

【解決手段】 以下の工程(i)～(iii)：

(i)骨転移を含む腫瘍の多臓器転移を示す非ヒトモデル動物を作製する工程、

(ii)該モデル動物に被験物質を投与する工程、

(iii)骨転移の抑制及び／または予防効果を測定する工程、

を含む、腫瘍の骨転移を抑制及び／または予防するための薬剤のスクリーニング方法を提供する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日	1990年 9月 5日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名	中外製薬株式会社